

VODIKOV SULFID – SIGNALNA MOLEKULA S TERAPEVTSKIM POTENCIALOM

HYDROGEN SULFIDE – A SIGNALING MOLECULE WITH THERAPEUTIC POTENTIAL

AVTORJA / AUTHORS:

Tajda Pavlin, dipl. ing. lab. biomed.
izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: janez.mravljak@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

Vodikov sulfid je poleg ogljikovega monoksida in dušikovega oksida pomembna signalna molekula, ki se endogeno sintetizira s pomočjo specifičnih encimov. Sodeluje pri številnih fizioloških procesih, kot so vazodilatacija, nevromodulacija in zaščita nevronov. Pomembna je tudi njegova vloga pri zaščiti celic pred oksidativnim stresom, raziskave pa so pokazale, da sodeluje pri uravnavanju apoptoze in proliferacije celic. Poleg tega ima protivnetne učinke, v določenih okoliščinah pa lahko deluje tudi provnetno. Kljub številnim koristnim učinkom je v visokih koncentracijah toksičen, saj zavira citokrom c oksidazo, kar zaustavi delovanje dihalne verige, vodi v nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti in poškodbe celic. Donorje vodikovega sulfida bi lahko uporabili za zdravljenje določenih stanj, kot so ishemija miokarda, neurodegenerativne bolezni in vnetna obolenja, vendar so nujne nadaljnje raziskave glede mehanizmov delovanja in varnosti teh spojin.

KLJUČNE BESEDE:

citokrom c oksidaza, neurodegenerativne bolezni, vazodilatacija, vodikov sulfid

ABSTRACT

Hydrogen sulfide, along with carbon monoxide and nitric oxide, is an important signaling molecule that is endogenously synthesized by specific enzymes. It is involved in various physiological processes, including vasodilation, neuromodulation, and neuroprotection. Its role in protecting cells from oxidative stress is significant, and research has shown that it also regulates apoptosis and cell proliferation. Additionally, hydrogen sulfide has anti-inflammatory properties, although in some contexts, it may exert pro-inflammatory effects. Despite its many beneficial actions, it is toxic at high concentrations, as it inhibits cytochrome c oxidase, disrupting the respiratory chain, promoting the formation of reactive oxygen species, and leads to cellular damage. Hydrogen sulfide donors show potential for treating conditions such as myocardial ischemia, neurodegenerative diseases, and inflammatory disorders; however, their mech-

anisms of action and safety profiles require further investigation.

KEY WORDS:

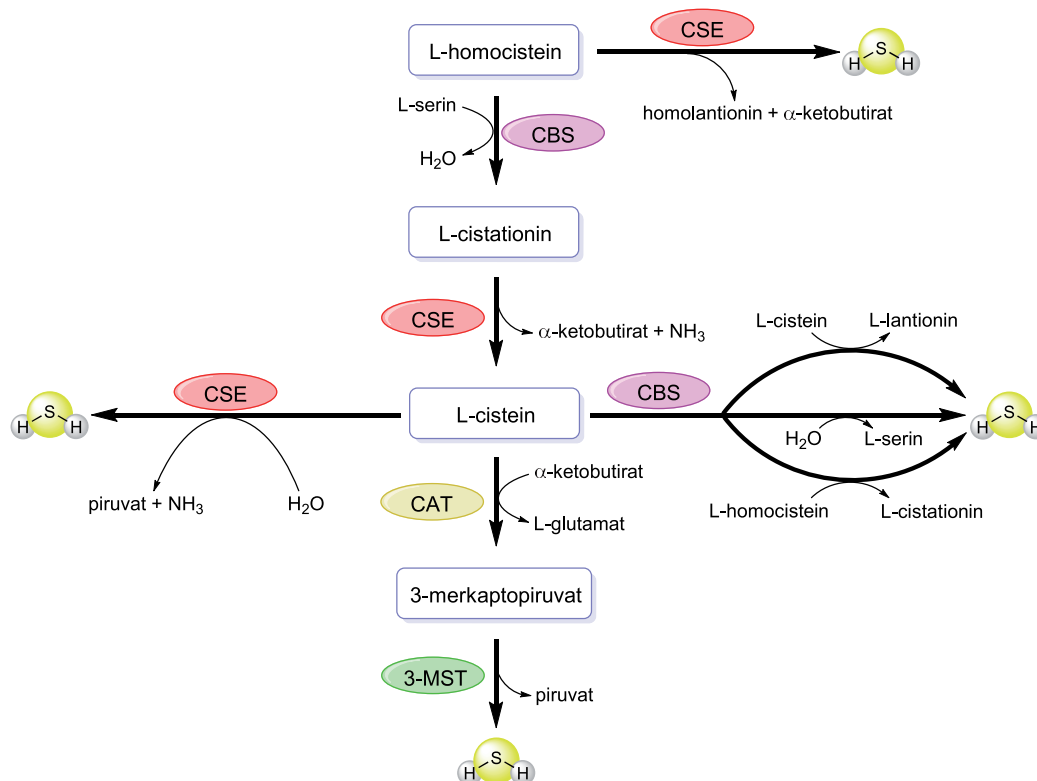
cytochrome c oxidase, hydrogen sulfide, neurodegenerative diseases, vasodilation

1 UVOD

Vodikov sulfid (H_2S) je bil v zadnjih desetletjih prepoznani kot ena izmed ključnih signalnih molekul, poleg dušikovega oksida (NO) in ogljikovega monoksida (CO). Gre za molekulo, ki je pri sobni temperaturi v plinastem agregatnem stanju in jo celice proizvajajo endogeno, njen pomen pa se

kaže v širokem spektru fizioloških in patofizioloških procesov. Sinteza H_2S poteka s pomočjo treh glavnih encimov: cistationin β -sintaze (CBS), cistationin γ -liaze (CSE) in 3-merkaptopiruvat sulfurtransferaze (3-MST). Ti encimi so različno razporejeni po tkivih in organih ter imajo specifične mehanizme delovanja (1).

CBS je v največji meri prisoten v centralnem živčnem sistemu, kjer omogoča sintezo H_2S po več poteh: s hidrolizo cisteina v serin in H_2S ; s kondenzacijo cisteina in homocisteina v cistationin in H_2S ; ter s kondenzacijo dveh molekul cisteina v lantionin in H_2S . CSE je ključni encim v žilnem sistemu in gladkomišičnih celicah, kjer katalizira sintezo H_2S iz cisteina in homocisteina (1). CBS in CSE sta citosolna encima, medtem ko je 3-MST prisoten tako v citosolu kot v mitohondrijih večine celic in tkiv. Pri sintezi H_2S deluje skupaj s cistein aminotransferazo (CAT), kjer CAT najprej pretvori cistein v 3-merkaptopiruvat, ki ga nato 3-MST pretvori v H_2S (slika 1) (1, 2).



Slika 1: Biokemijske encimske poti, vključene v sintezo vodikovega sulfida iz aminokislin, ki vsebujejo žveplo (1, 7). CAT – cistein aminotransferaza, CBS – cistationin β -sintaza, CSE – cistationin γ -liaza, 3-MST – 3-merkaptopiruvat sulfurtransferaza

Figure 1: Biochemical enzymatic pathways involved in the synthesis of hydrogen sulfide from sulfur-containing amino acids (1, 7). CAT – cysteine aminotransferase, CBS – cystathionine β -synthase, CSE – cystathionine γ -lyase, 3-MST – 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase

H₂S lahko prosto prehaja skozi fosfolipidne membrane in neposredno vpliva na številne tarčne proteine preko persulfidacije (3, 4). V procesu persulfidacije H₂S reagira s tiolnimi skupinami (R-SH) cisteinskih ostankov, pri čemer nastane persulfid (R-SSH). Opisana reakcija posledično vpliva na aktivnost različnih proteinov, ki sodelujejo pri številnih fizioloških procesih (1, 4). Namen tega članka je podrobneje predstaviti vlogo H₂S v bioloških procesih, njegovo toksičnost ter preučiti morebitne terapevtske aplikacije te molekule.

2 FIZIOLOŠKA VLOGA

2.1 VAZODILATACIJA

Ena ključnih nalog H₂S v žilnem sistemu je vazodilatacija (5). V endotelijskih in gladkomišičnih celicah H₂S nastaja predvsem s pomočjo encima CSE, njegovo delovanje pa modulirajo različni endogeni dejavniki, med njimi tudi •NO, ki z njim tvorno sodeluje pri uravnavanju žilnega tonusa (3, 5, 6). H₂S deluje tako na endotelijske kot na gladkomišične celice, njegov sprožilni mehanizem pa temelji na persulfidaciji kalijevih ionskih kanalov, kar poveča njihovo aktivnost (5, 6). Ob stimulaciji se H₂S sintetizira v endotelijskih celicah, kjer povzroči njihovo hiperpolarizacijo; ta se preko tesnih stikov prenese na gladkomišične celice. H₂S lahko tudi difundira v gladkomišične celice in tam aktivira ATP-odvisne kalijeve kanale, kar vodi v njihovo hiperpolarizacijo in posledično vazodilatacijo (6). Čeprav se H₂S sintetizira tudi v gladkomišičnih celicah, je za vazodilatacijo ključna endotelijska hiperpolarizacija (7).

2.2 OKSIDATIVNI STRES

Glutation (GSH) je pomemben antioksidant, sestavljen iz cisteina, glutamata in glicina. Ker so znotrajcelične koncentracije cisteina nižje kot koncentracije glutamata in glicina, je za celice ključnega pomena transport cistina v celico preko cistin/glutamatnega antiporterja. V celici se cistin reducira v cistein, ki se nato porabi za sintezo GSH. H₂S poveča prenos cistina preko antiporterja, poleg tega pa lahko reducira cistin v cistein že v zunajceličnem prostoru. Tako nastali cistein se prenese v celico s prenašalci ekscitatornih aminokislin, kjer se porabi za sintezo GSH. Ta mehanizem ima ključno vlogo zlasti pri z glutatom povzro-

čeni oksidativni toksičnosti, kjer se zaradi povečane zunajcelične koncentracije glutamata zmanjša prenos cistina v celico in posledično zmanjša sintezo GSH. H₂S prav tako poveča prenos glutationa v mitohondrije, ki ga sami ne morejo sintetizirati (8).

Encim 3-MST, ki je prisoten tako v mitohondrijih kot v citosolu, je ključnega pomena za sintezo H₂S, njegova aktivnost pa je regulirana z oksidacijo cisteinskih ostankov. Oksidativni stres pomembno vpliva na sintezo H₂S, saj že blage do zmerne koncentracije vodikovega peroksida povzročijo oksidacijo specifičnih cisteinskih ostankov in s tem inaktivacijo encima (2). Posledično oksidativni stres zmanjša sintezo H₂S in s tem oslabi antioksidativno zaščito celice. Zaradi tega ima H₂S dvojno vlogo: na eni strani blaži oksidativni stres, na drugi pa je njegova lastna sinteza občutljiva na oksidativne razmere.

2.3 ŽIVČNI SISTEM

Vodikov sulfid je pomemben nevromodulator. Študije navajajo, da fiziološke koncentracije H₂S selektivno povečajo odzive, ki jih posredujejo receptorji za N-metil-D-aspartat (NMDA), in olajšajo dolgotrajno povečanje sinaptične moči v hipokampusu, kar nakazuje na njegovo vlogo pri asociativnem učenju (9, 10, 11). Nasprotno pa visoke koncentracije H₂S nad 130 μM zavirajo sinaptični prenos. Mehanizem verjetno vključuje vpliv na kalcijeve kanale (npr. T-tip, Cav3.2), kar zmanjša vstop Ca²⁺ in posledično eksocitozo nevrotansmitorjev (11). Poleg nevromodulacijske vloge H₂S ščiti nevrone pred oksidativnim stresom z zvišanjem aktivnosti γ-glutamilcistein sintetaze in s povečanjem transporta cistina v celico, kar vodi v večjo tvorbo glutationa (12). H₂S vpliva tudi na astrocite, saj z višanjem znotrajcelične koncentracije Ca²⁺ ionov sproži kalcijeve valove. Ti valovi lahko nastanejo spontano ali kot odziv na dražljaje, pri čemer jih lahko sproži tudi ekscitacija nevronov. H₂S, sproščen kot odgovor na nevronske vzbujanje, lahko aktivira Ca²⁺ kanale in tako sproži širjenje kalcijevih valov v sosednje astrocite, kar omogoča medcelično komunikacijo ter prispeva k modulaciji sinaptične aktivnosti (10). Skupno H₂S deluje kot pomemben mediator v komunikaciji med nevroni in glija celicami ter prispeva k zaščiti pred škodljivimi vplivi oksidativnega stresa (10, 11, 12).

2.4 VNETHJE

Vodikov sulfid igra pomembno vlogo pri vnetju, kar podpirajo številne študije. Donorja H₂S, kot sta natrijev hidrosulfid

(NaHS) in natrijev sulfid (Na_2S), zmanjšujeta adhezijo levkocitov na žilni endotelij, zmanjšujeta infiltracijo levkocitov (predvsem nevtrofilcev in v manjši meri limfocitov) in nastanek edema. Z zaviranjem endogene sinteze H_2S pa se pojavijo nasprotni učinki. Protivnetno delovanje H_2S naj bi bilo povezano z aktivacijo od ATP-odvisnih kalijevih kanalov (13).

Kljub temu nekatere študije poročajo tudi o provnetni vlogi H_2S (13, 14). Opazili so, da H_2S spodbuja izražanje različnih provnetnih citokinov prek aktivacije jedrnega dejavnika κB (NF- κB), ki ima ključno vlogo pri uravnavanju vnetja, celične proliferacije in apoptoze. Ta proces je še posebej izrazit v monocitih, kjer z zunajceličnimi signali uravnava kinaza (ERK) sproži signalne poti, ki vodijo do aktivacije NF- κB in posledičnih provnetnih učinkov. Natančna signalna pot še ni povsem pojasnjena (14).

2.5 URAVNAVANJE CELIČNE SMRTI IN PROLIFERACIJE

Dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α) inducira ekspresijo encima CSE, ki nato sintetizira H_2S . Glede na raziskave, kjer so učinke opazovali na mišjih jetrnih celicah in celicah HEK-293 (t. i. *human embryonic kidney 293 cells*), predpostavljajo, da nastali H_2S sulfidira cistein 38 na podenoti p65 prepisovalnega dejavnika NF- κB , ta modifikacija pa okrepi vezavo koaktivatorja RPS3. Kompleks aktivatorja in koaktivatorja nato spodbuja prepisovanje antiapoptotskih genov, kar omogoča preživetje celic (15). Pomembno je tudi opažanje Yanga in sod., da so endogene koncentracije H_2S ključne za regulacijo apoptoze v gladkomišičnih celicah (16). Nasprotno pa so raziskave na človeških gladkomišičnih celicah aorte pokazale, da H_2S aktivira signalno pot ERK, ki sproži apoptotsko signalizacijo in vodi do aktivacije kaspaze-3 ter posledične apoptoze. Natančna molekularna pot tega procesa še ni popolnoma razjasnjena (17).

Regulacija s potjo CSE/ H_2S ne vpliva le na celično smrt, temveč tudi na celično rast in proliferacijo. Povečana ekspresija encima CSE in s tem povečana sinteza H_2S zavirata celično proliferacijo in sintezo DNA. To spremlja povečana aktivnost ERK, kar vodi v indukcijo izražanja zaviralca od ciklina odvisne kinaze (p21^{Cip1}), ki zavira celično rast. Čeprav igra ERK in p21^{Cip1} ključno vlogo pri zaviranju celične rasti, je verjetno, da pri tem sodelujejo tudi druge molekule (18). Nasprotno pa aplikacija eksogenega L-cisteina, ki poveča endogeno tvorbo H_2S , spodbuja proliferacijo nevronske matične celice (19). H_2S lahko vpliva tako na celično preživetje kot na proliferacijo, vendar pa so za celovi-

tejše razumevanje vpletenih mehanizmov potrebne dodatne raziskave.

3 TOKSIČNOST

Literatura navaja, da se koncentracije H_2S , sintetiziranega v telesnih tkivih, običajno gibljejo med 30 in 300 μM (6), medtem ko Furne in sod. predpostavljajo, da je dejanska koncentracija prostega H_2S bistveno nižja, okoli 15 nM (20). Ko omenjamo izpostavljenost H_2S , se koncentracije v zraku izražajo v številu delov na milijon delov (ppm). Izpostavljenost koncentracijam med 20 in 50 ppm povzroči draženje oči in dihalnega sistema, medtem ko lahko vdihavanje koncentracij 100–250 ppm za kratek čas vodi v izgubo koordinacije ter motoričnih sposobnosti. Pri približno 500 ppm (~ 15 mM) se lahko razvije pljučni edem, izpostavljenost koncentracijam nad 600 ppm pa je lahko smrtnosna že po 30 minutah. Koncentracije nad 800 ppm veljajo za smrtno nevarne (1, 21). Zakaj torej H_2S povzroča take učinke?

Citokrom c oksidaza, končni encim dihalne verige, katalizira prenos elektronov iz reduciranega citokroma c na kisik. Akutna izpostavljenost vodikovemu sulfidu (preko njegovega donorja NaHS) že v nekaj minutah reverzibilno zavira delovanje citokrom c oksidaze. Ob popolnem zaviranju encima se na njegov binuklearni center vežeta dve molekuli H_2S : ena na reducirani ion bakra, druga pa na oksidirani hem a₃, kar prepreči vezavo kisika in s tem učinkovito ustavi dihalno verigo (7, 22). Ker je citokrom c oksidaza ključna za vzdrževanje transmembranskega protonskega gradienta, potrebnega za sintezo molekul ATP z ATP sintazo, njeno zaviranje vodi v energetske krize. Celica nato kompenzatorno poveča glikolizo, kar lahko povzroči celično acidozo. Ta pa dodatno spodbuja nastanek reaktivnih zvrsti, kar lahko vodi v celično smrt (7, 21).

Zaviranje citokrom c oksidaze poviša koncentracijo superoksidnega radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$) zaradi prekinjene redukcije kisika v vodo. Superoksidni radikal hitro dismutira (spontano ali ob prisotnosti superoksid dismutaze) v vodikov peroksid (H_2O_2), ki nato vstopi v Fentonovo reakcijo s prostimi železovimi ioni. S tem nastane hidroksidni anion (HO^-) in visoko reaktiven hidroksilni radikal ($\text{HO}^{\bullet}$) (21). Medtem ko superoksidne radikale in H_2O_2 večinoma nevtralizirata superoksid dismutaza in katalaza, pa hidroksilni radikal neposredno poškoduje celične membrane, DNA in proteine



ter lahko sproži celično smrt (21). Prisotnost H_2S in prostega železa dodatno omogoča nastanek reaktivnih žveplovih spojin, kot so vodikov persulfid/polisulfid (H_2S_n ; $n \geq 2$), tiol persulfidi z majhno molekulsko maso (RSSH), proteinski persulfidi (PS-SH), različni polisulfidi ($RSS_{(n)}H$, $RSS_{(n)}R$ in H_2S_n ; $n > 1$), sulfenske kisline (RSOH), nitrozotioili (RSNO) in različne oblike sulfidnih mostov (PS-SR, RS-S-SR in $RS-S_n-SH$) (1, 21, 23).

4 TERAPEVTSKI POTENCIAL

Najpogostejše uporabljena skupina donorjev H_2S v raziskavah so sulfidne soli, kot sta NaHS in Na_2S . Njihova uporaba povzroči hiter porast koncentracije H_2S , vendar so zaradi hitrega izhlapevanja plina potrebni pogosti in visoki odmerki (24).

Za bolj nadzorovano sproščanje plina so razvili donor GYY4137, ki preko počasne hidrolize postopno sprošča H_2S (slika 2). GYY4137 se običajno pripravlja kot diklorometanski kompleks, kar lahko vodi v presnovo diklorometana do ogljikovega monoksida (CO), zato nekateri opaženi učinki morda izvirajo tudi iz delovanja CO. Poleg tega počasno sproščanje H_2S otežuje razločevanje med učinki samega plina, nerazgrajenega GYY4137 in morebitnih stranskih produktov (24).

Relativno nova skupina donorjev H_2S so hibridne učinkovine donorjev H_2S , združenih z nesteroidnimi protivnetnimi zdravili (H_2S -NSAID). Sestavljene so iz klasične nesteroidne protivnetne učinkovine, ki zavira encim ciklooksigenazo, ter dodane strukture, ki sprošča H_2S . Tako združujejo protivnetni učinek z biološkimi učinki H_2S (26). Razvoj novih učinkovin na tem področju še vedno intenzivno poteka. Kljub temu da se večina raziskav osredotoča na uporabo donorjev H_2S in posledično zviševanja njegovih koncen-

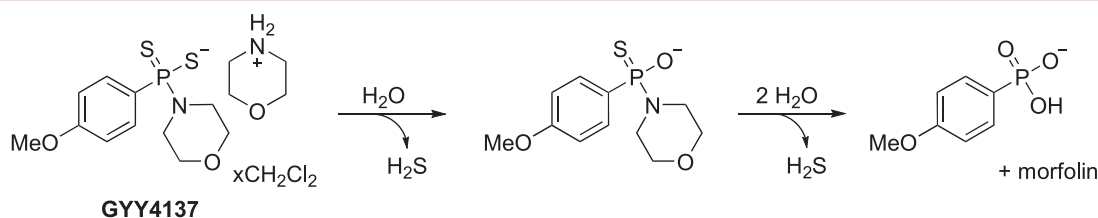
tracij, lahko v določenih patofizioloških stanjih izkoristimo zaviranje endogene sinteze H_2S . Najbolje preučeni zaviralci so propargil glicin, β -cianoalanin in aminooksicetna kislina (7). Ob tem je treba poudariti, da kljub obetavnim farmakološkim učinkom H_2S obstaja negotovost glede optimalnih terapevtskih koncentracij in možnih neželenih učinkov. Zaradi omejenih podatkov so potrebne nadaljnje farmakološke in toksikološke raziskave, ki bi omogočile natančno določitev varnih terapevtskih koncentracij za posamezne indikacije ter zagotovile zanesljivo oceno tveganja za neželene učinke in morebitno zastrupitev.

4.1 ISHEMIJA MIOKARDA

Testiranja na miših so pokazala, da lahko H_2S omeji poškodbe, povezane z ishemijo miokarda, z zaviranjem migracije in adhezije levkocitov. Poleg tega H_2S ohranja strukturo in funkcijo mitohondrijev po ishemični poškodbi, kar je ključno za preprečevanje celične smrti. Hkrati lahko ščiti kardiomiocite z zaviranjem citokrom c oksidaze, kar zmanjša nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, ki bi sicer lahko povzročile dodatne poškodbe. Raziskave so prav tako pokazale, da H_2S zmanjša aktivacijo kaspaze-3 ter posledično zavira potek apoptoze poškodovanih miocitov, vendar te niso bile izvedene na testnih modelih *in vivo*. Kljub temu ima H_2S velik potencial za zmanjšanje poškodb in zaščito celic, zaradi česar bi lahko bil koristen pri preprečevanju nadaljnjih poškodb miokarda po ishemičnem dogodku (27).

4.2 NEVRODEGENERATIVNE BOLEZNI

Vse več raziskav se osredotoča na vlogo H_2S v centralnem živčevju in pri različnih nevrodegenerativnih boleznih. Pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo predpostavljajo, da H_2S sulfidira encim kinazo 3β glikogen sintaze (GSK3 β), kar zavira fosforilacijo proteina Tau in s tem preprečuje nevro-



Slika 2: Dvostopenjska hidroliza donorja H_2S GYY4137 (25).

Figure 2: Two-step hydrolytic degradation of H_2S donor GYY4137 (25).

toksičnost. Poleg tega H_2S ojača signalno pot prepisovalnega dejavnika Nrf2, ki uravnava odziv na oksidativni stres, ter povečuje sintezo GSH. Aktivacija te poti s H_2S bi lahko predstavljala učinkovito strategijo za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni (28).

V okviru preiskav Parkinsonove bolezni so na človeških celicah nevroblastoma pokazali, da izpostavitve celic NaHS zmanjšuje apoptozo in zvišuje ravni GSH, kar ščiti nevrone pred oksidativnim stresom. Tudi ta mehanizem nakazuje potencial H_2S pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni (29). Kljub obetavnim rezultatom so potrebne dodatne študije, da bi potrdili te ugotovitve, podrobneje razumeli mehanizme delovanja H_2S in ocenili terapevtski odmerek.

4.3 BOLEČINA

Raziskovalci so ugotovili, da NaHS povzroči povečano izražanje podenote receptorja NMDA, imenovane NR2B, v hrbtenjači. Ta igra pomembno vlogo pri prenašanju bolečinskih signalov in razvoju hiperalgezije. V raziskavi so z zaviranjem receptorjev NMDA odpravili NaHS-inducirano hiperalgezijo, kar kaže na ključno vlogo aktivacije receptorjev NMDA v razvoju hiperalgezije, povzročene s H_2S . Ti rezultati nakazujejo, da bi lahko zaviranje sinteze H_2S ali njegovo odstranjevanje predstavljalo obetavno terapevtsko možnost za zdravljenje nevropatske bolečine (30).

5 SKLEP

Vodikov sulfid je pomembna signalna molekula, ki sodeluje pri mnogih fizioloških procesih. Poleg vazodilatacije in nevromodulacije prispeva k zmanjševanju oksidativnega stresa, uravnavanju vnetnih procesov ter regulaciji celične apoptoze in proliferacije.

Kljub toksičnosti pri višjih koncentracijah, ko z zaviranjem citokrom c oksidaze zaustavi delovanje dihalne verige, vse več študij nakazuje na njegov terapevtski potencial. Uporaba H_2S ali njegovih donorjev bi lahko zmanjšala poškodbe po ishemičnem dogodku ter imela vlogo pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni. Pri lajšanju bolečine bi lahko bili pomembni tudi zaviralci encimov, ki sodelujejo pri sintezi H_2S . Za celovito razumevanje mehanizmov delovanja H_2S in njegovih potencialnih kliničnih aplikacij pa so potrebne dodatne raziskave, pri čemer je ključno tudi vrednotenje možnih neželenih učinkov.

6 LITERATURA

1. Andrés CMC, Pérez de la Lastra JM, Andrés Juan C, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. Chemistry of Hydrogen Sulfide-Pathological and Physiological Functions in Mammalian Cells. *Cells*. 2023 Nov 22;12(23):2684.
2. Módos K, Asimakopoulou A, Coletta C, Papapetropoulos A, Szabo C. Oxidative stress suppresses the cellular bioenergetic effect of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase/hydrogen sulfide pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Apr 19;433(4):401–7.
3. Riahi S, Rowley CN. Why can hydrogen sulfide permeate cell membranes? *J Am Chem Soc*. 2014 Oct 29;136(43):15111–3.
4. Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, et al. H_2S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal*. 2009 Nov 10;2(96):ra72.
5. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of $H(2)S$ as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001 Nov 1;20(21):6008–16.
6. Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Stepan J, Jung SM, Bhunia AK, et al. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res*. 2011 Nov 11;109(11):1259–68.
7. Cirino G, Szabo C, Papapetropoulos A. Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs. *Physiol Rev*. 2023 Jan 1;103(1):31–276.
8. Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Jan;12(1):1–13.
9. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*. 1996 Feb 1;16(3):1066–71.
10. Nagai Y, Tsugane M, Oka J, Kimura H. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J*. 2004 Mar;18(3):557–9.
11. Kamat PK, Kalani A, Tyagi N. Role of Hydrogen Sulfide in Brain Synaptic Remodeling. *Methods Enzymol*. 2015 Jan 13;555:207–229.
12. Kimura Y, Dargusch R, Schubert D, Kimura H. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Mar-Apr;8(3-4):661–70.
13. Zano R, Brancialeone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J*. 2006 Oct;20(12):2118–20.
14. Zhi L, Ang AD, Zhang H, Moore PK, Bhatia M. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF-kappaB pathway. *J Leukoc Biol*. 2007 May;81(5):1322–32.
15. Sen N, Paul BD, Gadalla MM, Mustafa AK, Sen T, Xu R, et al. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-kB mediates its antiapoptotic actions. *Mol Cell*. 2012 Jan 13;45(1):13–24.
16. Yang G, Wu L, Wang R. Pro-apoptotic effect of endogenous H_2S on human aorta smooth muscle cells. *FASEB J*. 2006 Mar;20(3):553–5.
17. Yang G, Sun X, Wang R. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *FASEB J*. 2004 Nov;18(14):1782–4.



18. Yang G, Cao K, Wu L, Wang R. Cystathionine gamma-lyase overexpression inhibits cell proliferation via a H₂S-dependent modulation of ERK1/2 phosphorylation and p21Cip/WAK-1. *J Biol Chem*. 2004 Nov 19;279(47):49199–205.
19. Wang Z, Liu DX, Wang FW, Zhang Q, Du ZX, Zhan JM, et al. L-Cysteine promotes the proliferation and differentiation of neural stem cells via the CBS/H₂S pathway. *Neuroscience*. 2013 May 1;237:106–17.
20. Furne J, Saeed A, Levitt MD. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(5):R1479–85.
21. Truong DH, Eghbal MA, Hindmarsh W, Roth SH, O'Brien PJ. Molecular mechanisms of hydrogen sulfide toxicity. *Drug Metab Rev*. 2006;38(4):733–44.
22. Di Meo I, Fagiolarì G, Prella A, Viscomi C, Zeviani M, Tiranti V. Chronic exposure to sulfide causes accelerated degradation of cytochrome c oxidase in ethylmalonic encephalopathy. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jul 15;15(2):353–62.
23. Kolluru GK, Shen X, Kevil CG. Reactive Sulfur Species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2020;40(4):874–884.
24. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem Pharmacol*. 2018 Mar;149:110–123.
25. Alexander BE, Coles SJ, Fox BC, Khan TF, Maliszewski J, Perry A, et al. Investigating the generation of hydrogen sulfide from the phosphonamidodithioate slow-release donor GYY4137. *Med. Chem. Commun*. 2015;6:1649–1655.
26. Mijušković A, Wray S, Arrowsmith S. A hydrogen sulphide-releasing non-steroidal anti-inflammatory, ATB-346, significantly attenuates human myometrial contractions. *Pharmacol Rep*. 2025 Feb;77(1):287–294.
27. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25;104(39):15560–5.
28. Giovino D, Bursac B, Sbodio JI, Nalluru S, Vignane T, Snowman AM, et al. Hydrogen sulfide is neuroprotective in Alzheimer's disease by sulphydrating GSK3 β and inhibiting Tau hyperphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jan 26;118(4):e2017225118.
29. Liu L, Wang J, Wang H. Hydrogen sulfide alleviates oxidative stress injury and reduces apoptosis induced by MPP⁺ in Parkinson's disease cell model. *Mol Cell Biochem*. 2020 Sep;472(1–2):231–240.
30. Zhao S, Liu FF, Wu YM, Jiang YQ, Guo YX, Wang XL. Upregulation of spinal NMDA receptors mediates hydrogen sulfide-induced hyperalgesia. *J Neurol Sci*. 2016 Apr 15;363:176–81.